

HbF 变异体对三种不同 HbA1c 检测系统的干扰评价*

武冬娜, 石喜习, 聂菲, 王晓倩, 贾卉 (西北妇女儿童医院检验科, 西安 710061)

摘要:目的 评价血红蛋白变异体 F(HbF)对三种糖化血红蛋白(HbA1c)检测系统测定结果的干扰。三种方法分别为离子交换高效液相色谱法(IE-HPLC)、硼酸盐亲和层析高效液相色谱法(AC-HPLC)和免疫抑制比浊法。方法 分别用三种检测系统检测血红蛋白结构正常标本及含有胎儿血红蛋白(HbF)的标本,依据美国国家糖化血红蛋白标准化计划(NGSP)的判定标准,对检测结果进行比对分析和偏倚评估。结果 以 Primus Ultra2(AC-HPLC)为比较系统,IE-HPLC 和免疫比浊法为检测系统,两种检测系统与比较系统检测正常样品 HbA1c 值的相关性良好。当 HbF \leq 8.75%时,IE-HPLC 测定结果与比较系统偏差 \leq 6%;HbF 为 17.50%时,IE-HPLC 测定结果与比较系统偏差 $>$ 6%;当 HbF 浓度达 35.00%~70.00%时 IE-HPLC 无法检测出结果。免疫比浊法测定不同 HbF 浓度 HbA1c 值与比较系统偏差均 \leq 6%,测试几乎不受 HbF 的干扰。结论 HbF 对不同 HbA1c 检测系统的干扰程度不同,临床实验室在进行 HbA1c 检测时,应注意血红蛋白变异体的存在,必要时选用替代指标或者合适的方法进行 HbA1c 测定以防止干扰的发生。

关键词:血红蛋白 F;血红蛋白 A;糖基化

中图分类号:R446.112 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2016)02-099-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.02.029

Evaluation of Interference of Variant Hemoglobin F on Three Different HbA1c Measurement Systems

WU Dong-na, SHI Xi-xi, NIE Fei, WANG Xiao-qian, JIA Hui

(Department of Clinical Laboratory,

Northwest Women's and Children's Hospital, Xi'an 710061, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the interference of variant hemoglobin F (HbF) on three kinds of glycosylated hemoglobin (HbA1c) testing systems. The three methods were ion exchange high performance liquid chromatography (HPLC) method, affinity chromatography HPLC method and immunosuppression turbidimetry respectively. **Methods** To measure normal hemoglobin structure specimens and contain fetal hemoglobin (HbF) specimens with three measurement systems respectively, according to the standards of the National Glycated hemoglobin Standardization Program (NGSP), the results were comparatively analyzed and bias evaluated. **Results** Took the Primus Ultra2 (AC-HPLC) as comparing system, the Variant II and immune turbid metric method as the detection system. The testing results of those testing systems had good correlation for various concentrations with normal hemoglobin HbA1c blood samples. When the HbF \leq 8.75%, the deviation was less than 6% between IE-HPLC determination and comparison system. When HbF was 17.50%, the deviation was greater than 6% between IE-HPLC determination and comparison system. When HbF concentration was 35.00%~70.00%, IE-HPLC could not be detected. The deviation was less than 6% between Immune turbid metric method and comparison system for different HbF concentration of HbA1c. The test was almost without any interference of HbF. **Conclusion** The interference degree of HbF on different HbA1c detection systems were different when tested HbA1c in clinical laboratory, should pay attention to the existence of hemoglobin variant. If necessary, choose alternative indicators or appropriate method to determinate HbA1c to prevent interference.

keywords: hemoglobin F; hemoglobin A; hemoglobin glycosylation

糖化血红蛋白(glycated hemoglobin, HbA1c)是评价糖尿病患者长期血糖控制和并发症风险的生物指标。2010年起美国糖尿病联合会(american diabetes association, ADA)将 HbA1c $>$ 6.5%作为糖尿病的诊断标准之一。我国近年来也日益重视 HbA1c 的标准化工作,血红蛋白变异体(HbF)作

为 HbA1c 实验室检测的一个干扰因素,因其对血糖评估可能造成影响而引起广泛关注。本研究采用三种不同原理检测系统来评价 HbF 对 HbA1c 测试的干扰,旨在了解各种常规 HbA1c 检测方法对 HbF 的抗干扰性能,保证 HbF 变异体人群 HbA1c 检测的准确性。

* 作者简介:武冬娜(1976-),女,硕士,主管检验师,专业:生化检验,E-mail:dongna2860@sina.com。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2015年1月~6月在西北妇女儿童医院就诊的妊娠期糖尿病患者20例,除外尿毒症、贫血患者,年龄28~40岁。妊娠期糖尿病的诊断标准符合世界卫生组织(WHO)1999年诊断标准。所有样本经毛细管蛋白电泳排除血红蛋白变异。采集脐血1例备用。

1.2 试剂和仪器 美国BioRad公司Variant II Turbo全自动糖化血红蛋白分析仪,美国Primus Ultra2全自动糖化血红蛋白分析仪,糖化血红蛋白试剂(美国Bio-Rad公司,Primus公司)均采用配套试剂,免疫比浊法采用北京利得曼试剂和配套校准品,检测仪器为AU5800。Sebia Capillarys毛细管蛋白电泳分析仪及配套试剂。

1.3 方法

1.3.1 检测方法:BioRad Variant II Turbo采用离子交换高效液相色谱法(ionexchange high performance liquid chromatography, IE-HPLC)检测,Primus Ultra2采用硼酸盐亲和层析高效液相色谱法(affinity chromatography high performance liquid chromatography, AC-HPLC)。

1.3.2 标本采集:HbA1c 静脉抽血1 ml, EDTA-K₂ 抗凝,所有收集的标本储存于-20℃保存,避免反复冻融。

1.3.3 不同浓度HbF的制备:将20例糖尿病患者样本混匀,用IE-HPLC和AC-HPLC各检测HbA1c浓度3次(IE-HPLC:9.9%,9.9%,9.8%; AC-HPLC:9.7%,9.7%,9.8%),计算HbA1c均值为9.8%,将脐血样本[胎儿血红蛋白(HbF)浓度约为70%]与混匀后的糖尿病患者血液样本按1:9混合。使混合样本HbF浓度约为7%。用2种方法同时检测混合样本的HbA1c浓度(IE-HPLC法:9.3%,9.3%,9.4%; AC-HPLC法:9.2%,9.1%,9.1%),取均值为9.2%。从而计算出新生儿脐带血液样本中HbA1c的浓度约为4.2%。将新生儿脐带血作为第1份,混合后糖尿病患者血液样本分为9份,分别将脐血进行1,1.5,2,4,8,16,32,64倍稀释,稀释后各管HbF理论浓度分别为70.0%,46.7%,35%,17.5%,8.75%,4.38%,2.19%和1.09%。各管HbA1c理论浓度分别为4.2%,6.07%,7.00%,8.40%,9.10%,9.45%,9.63%和9.71%。

1.3.4 HbF变异体组三种检测系统的比对分析和偏倚评估:参照有关文献^[1,6],以Primus Ultra2作为比较系统,Variant II和免疫比浊法为检测系统,检测HbA1c含量在4.2%~9.71%,HbF含量在1.09%~70%范围内的全血样本。

1.4 统计学分析 应用SPSS17.0软件对各检测系统与比较系统的相关性进行统计学分析。依据NGSP能力验证可接受标准^[1],对实验数据进行偏差百分比分析,HbA1c检测系统与比较系统偏差<6%为可接受。

2 结果

2.1 各检测系统检测正常样品HbA1c值的相关性 见表1。Primus Ultra2测试系统溯源到IF-CC,以Primus Ultra2为比较系统,两种检测系统与比较系统的相关性良好。

表1 各检测系统正常样品HbA1c检测值的相关性

检测系统名称	相关系数	回归方程
Variant II Turbo	0.993	$Y=0.987X+0.031$
免疫比浊法	0.977	$Y=1.021X+0.005$

2.2 各检测系统检测不同浓度HbF标本HbA1c值的对比分析和偏差评估 表2结果显示,AC-HPLC检测不同浓度HbF标本的HbA1c值与理论值偏差均<6%(CAP和NGSP能力验证可接受标准),表明AC-HPLC检测HbA1c几乎不受HbF干扰。以Primus Ultra2为比较系统,Variant II和免疫比浊法为检测系统。表3结果显示,当HbF≤8.75%时,IE-HPLC测定结果与比较系统偏差<6%;HbF为17.50%时,IE-HPLC测定结果与比较系统偏差>6%;当HbF浓度达35.00%~70.00%时IE-HPLC无法检测出结果。免疫比浊法测定不同HbF浓度HbA1c值与比较系统偏差均<6%,测试几乎不受HbF的干扰。

表2 AC-HPLC检测不同浓度HbF标本的HbA1c值与理论值偏差分析(%)

n	HbF浓度	HbA1c理论浓度	AC-HPLC	AC-HPLC(偏差%)
1	70.0	4.20	4.10	0.10(2.4)
2	46.7	6.07	5.90	0.17(2.8)
3	35.0	7.00	6.80	0.20(3.0)
4	17.5	8.40	8.10	0.30(3.5)
5	8.75	9.10	8.80	0.30(3.3)
6	4.38	9.45	9.10	0.35(3.7)
7	2.19	9.63	9.30	0.33(3.4)
8	1.09	9.71	9.40	0.31(3.2)

3 讨论 HbA1c是人体血液中葡萄糖与血红蛋白β链N末端缬氨酸残基以共价键结合的稳定的化合物,它反映了红细胞生命周期内的平均血糖水平。目前检测HbA1c的方法很多,不同的测定方法会受到各种干扰因素的影响,对变异血红蛋白干扰检测的研究有助于提高HbA1c检测的准确性。

HbF 是最常见的干扰 HbA_{1c} 检测的血红蛋白变异体之一。HbF 由 2 条 α 链和 2 条 β 链组成,是胚胎时期主要的血红蛋白,出生时,70% 的血红蛋白是 HbF,6 个月后降到 5% 以下。遗传性 HbF 持续存在的个体体内其浓度可达到总血红蛋白的

30%, β 地中海贫血和镰状细胞病患者体内 HbF 的浓度占总 Hb 的 2%~20% 不等。除此之外,HbF 增高还常见于妇女妊娠期、以及遗传性持续性胎儿血红蛋白增多症等。

表 3 检测系统和比较系统检测不同浓度 HbF 标本 HbA_{1c} 值的对比和偏差分析 (%)

n	HbF 浓度	AC-HPLC	IE-HPLC	免疫比浊	IE-HPLC(偏差)	免疫比浊偏差
1	70.0	4.10	0.00	3.90	4.10(100)	0.20(4.8)
2	46.7	5.90	0.00	5.70	5.90(100)	0.20(3.4)
3	35.0	6.80	0.00	6.60	6.80(100)	0.20(2.9)
4	17.5	8.10	7.40	7.80	0.70(8.6)	0.30(3.7)
5	8.75	8.80	8.70	8.60	0.10(1.1)	0.20(2.3)
6	4.38	9.10	9.00	8.90	0.10(1.1)	0.20(2.2)
7	2.19	9.30	9.20	9.00	0.10(1.1)	0.30(3.2)
8	1.09	9.40	9.20	9.10	0.20(2.1)	0.30(3.2)

糖化血红蛋白检测系统较多,其中 IE-HPLC 是基于血红蛋白 β 链末端与葡萄糖结合后,所带电荷不同而分离包括 HbA_{1c} 在内的血红蛋白不同组分,能够提示血红蛋白变异体,结果准确性取决于对变异体的分辨能力;AC-HPLC 是利用血红蛋白与葡萄糖结合所产生的特定基团可与硼酸特异结合的特性,从而分离糖化与非 HbA_{1c} 两个组分。它检测的糖化血红蛋白为总的糖化血红蛋白,此类方法不能提示血红蛋白变异体,结果准确性取决于变异体的糖化率和 HbA 的糖化率是否一致;免疫分析法是通过针对血红蛋白 β 链 N 末端 4~8 个氨基酸的单克隆或多克隆体的特异性,结合比色或比浊的方法,通过固定的波长直接测定 HbA_{1c} 的含量。

目前国内外相关文献对不同检测系统检测变异体样本时的抗干扰能力做了分析研究^[2~4],国内仅有两篇文献对 HbF 的干扰进行了研究报道^[6,7],这些研究普遍认为血红蛋白变异体会影响 HbA_{1c} 的检测准确性。国外有关 HbA_{1c} 干扰试验的报道均采用 Primus Ultra2 检测系统作为比较系统。本研究为了进一步验证 Primus Ultra2 不受 HbF 的干扰,以 Primus Ultra2 检测系统检测不同浓度 HbF 标本,发现 HbA_{1c} 检测值和理论值差异较小,在允许范围内和相关报道相符^[1,3],因此亦以 Primus Ultra2 检测系统为比较系统。对于不含血红蛋白变异体的正常样本,2 种检测系统和比较系统的相关性良好,偏差小于临床可接受范围,结果具有可比性。对含 HbF 变异体的样本,IE-HPLC 检测系统与比较系统检测结果的比对分析和偏倚评估结果显示,当 HbF 浓度 $\leq 8.75\%$ 时,IE-HPLC 测定结果与比较系统偏差 $< 6\%$;HbF 浓度

为 17.50% 时,IE-HPLC 测定结果与比较系统偏差 $> 6\%$;HbF 浓度达 35.00%~70.00% 时 IE-HPLC 无法检测出结果。表明 HbF 变异体影响 IE-HPLC 方法 HbA_{1c} 检测,具有显著的检测干扰作用。HbF $> 8.75\%$ 时,应避免使用 IE-HPLC 方法检测 HbA_{1c}。本研究得出的 HbF 干扰浓度限值和乔杰等^[6,7]的研究略有不同,这可能是由于 IE-HPLC 方法不同机型对变异体的分辨能力不同导致的。因为 HbF 的等电点与 HbA_{1c} 比较接近,在 IE-HPLC 检测过程中,HbA_{1c} 的峰大部分叠加在 HbF 峰中,所以在 HbF 浓度较高时,HbA_{1c} 的值明显偏低或检测不出。

免疫比浊检测系统与比较系统检测结果的比对分析和偏倚评估结果显示,对于含不同浓度 HbF 变异体的标本,免疫比浊法与比较系统样本的偏差均在临床可接受范围之内,表明免疫比浊法检测 HbA_{1c} 不受 HbF 的干扰。目前由于试剂盒性能的改进,抗体可特异性识别 IFCC 定义的血红蛋白 β 链 N 末端前四个氨基酸片段,因此免疫比浊法已不受常规变异体干扰。免疫比浊法作为检测 HbA_{1c} 的一种常规方法,对仪器设备要求不高,可在实验室原有各种生化仪进行检测,操作简便,收费低廉,适合在一、二级医院应用。

综上所述,本研究中三种检测系统对于无血红蛋白变异体样本 HbA_{1c} 的检测具有很好的相关性,结果可靠。HbF 变异体对 IE-HPLC 法的干扰不容忽视,检验人员在发出检验报告前应认真检查色谱图,关注 HbA_{1c} 检测系统的局限性和血红蛋白变异体的存在,谨慎识别 IE-HPLC 法测定 HbF 含量较高的标本,必要时选用替代指标或者合适的方法进行 HbA_{1c} 测定以防止干扰的发生。

参考文献:

- [1] Sthaneshwar P, Shanmugam H, Swan VG, et al. Effect of HbE heterozygosity on the measurement of HbA1c[J]. Pathology, 2013, 45(4): 417-419.
- [2] 徐安平, 夏勇, 纪玲. 血红蛋白变异体对不同糖化血红蛋白检测系统的干扰[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(12): 890-892.
Xu AP, Xia Y, Ji L. Interference of hemoglobin variants on HbA1c measuring systems[J]. Chin J Lab Med, 2014, 37(12): 890-892.
- [3] Rhea JM, Koch D, Ritchie J, et al. Unintended reporting of misleading HbA1C values when using assays incapable of detecting hemoglobin variants[J]. Arch Pathol Lab Med, 2013, 137(12): 1788-1791.
- [4] Little RR, Vesper H, Rohlfing CL, et al. Validation by a mass spectrometric reference method of use of boronate affinity chromatography to measure glycohemoglobin in the presence of hemoglobin S and C traits[J]. Clin Chem, 2005, 51(1): 264-265.
- [5] 温冬梅, 张秀明, 张德才, 等. HbE 变异体对 5 种糖化血红蛋白检测系统测定结果的干扰评价[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(12): 921-927.
Wen DM, Zhang XM, Zhang DC. Interference of hemoglobin E on measurements of glycosylated hemoglobin (HbA1c) [J]. Chin J Lab Med, 2014, 37(12): 921-927.
- [6] 乔杰, 钟方毅. 变异血红蛋白对两种糖化血红蛋白检测方法的影响[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2015, 36(25): 3790-3791.
Qiao J, Zhong FY. Influence of variation of hemoglobin on the two methods of glycosylated hemoglobin test[J]. Journal of Qiqihar University of Medicine, 2015, 36(25): 3790-3791.
- [7] 康建华, 杨立顺, 袁海生. 变异血红蛋白和氨基甲酸血红蛋白对糖化血红蛋白测定干扰的评价[J]. 检验医学, 2012, 27(6): 482-485.
Kang JH, Yang LS, Yuan HS. The evaluation of the interference of variant hemoglobin and carbamino hemoglobin to the detection of glycosylated hemoglobin [J]. Laboratory Medicine, 2012, 27(6): 482-485.
- 收稿日期: 2015-12-16
修回日期: 2016-02-04
-
- (上接 98 页)
- [3] 李瑾, 毛乃颖, 秦萌, 等. GeXP 多重 PCR 技术同时检测 12 种常见呼吸道病毒[J]. 病毒学报, 2011, 27(6): 526-532.
Li J, Mao NY, Qin M, et al. A GeXP based multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of twelve human respiratory viruses[J]. Chinese Journal of Virology, 2011, 27(6): 526-532.
- [4] 何玢, 王环宇, 张晨, 等. 8 种脑炎相关虫媒病毒 GeXP 检测方法的初步建立[J]. 病毒学报, 2012, 28(1): 57-62.
He B, Wang HY, Zhang C, et al. Development of a GeXP based multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of eight arboviruses related to encephalitis[J]. Chinese Journal of Virology, 2012, 28(1): 57-62.
- [5] Pretorius MA, Madhi SA, Cohen C, et al. Respiratory viral coinfections identified by a 10-plex real time reverse-transcription polymerase chain reaction assay in patients hospitalized with severe acute respiratory illness-South Africa, 2009-2010[J]. J Infect Dis, 2012, 206(suppl 1): 159-165.
- [6] Marccone DN, Ellis A, Videla C, et al. Viral etiology of acute respiratory infections in hospitalized and outpatient children in Buenos Aires, Argentina[J]. Pediatr Infect Dis J, 2013, 32(3): e105-e110.
- [7] Kouni S, Karakitsos P, Chranioti A, et al. Evaluation of viral co-infections in hospitalized and non-hospitalized children with respiratory infections using microrays[J]. Clin Microbiol Infect, 2013, 19(8): 772-777.
- [8] Luchsinger V, Ampuero S, Palomino MA, et al. Comparison of virological profiles of respiratory syncytial virus and rhinovirus in acute lower tract respiratory infections in very young Chilean infants, according to their clinical outcome[J]. J Clin Virol, 2014, 61(1): 138-144.
- [9] Panayiotou C, Richter J, Koliou M, et al. Epidemiology of respiratory syncytial virus in children in Cyprus during three consecutive winter seasons (2010-2013): age distribution, seasonality and association between prevalent genotypes and disease severity[J]. Epidemiol Infect, 2014, 142(11): 2406-2411.
- [10] Aksoy Gokmen A, Cicek C, Saz EU, et al. Detection of human metapneumovirus prevalence in pediatric patients with lower respiratory tract infections[J]. Mikrobiyol Bul, 2012, 46(4): 614-623.
- 收稿日期: 2016-01-05
修回日期: 2016-02-05